

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 18 SEP 2000

WIPO PCT

EP 00/06214

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

E J K N

**Aktenzeichen:** 199 33 024.7

**Anmeldetag:** 15. Juli 1999

**Anmelder/Inhaber:** Professor Dr. Thomas K i s s e l, Staufen/DE

**Bezeichnung:** Kationische Blockcopolymere

**IPC:** C 08 F 297/00

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Anmeldung.

München, den 13. Juni 2000  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Sailer

## Kationische Blockcopolymere

## 5 Beschreibung

Aus der WO98/59064 sind PEI-PEG-Blockcopolymere und deren Verwendung als Vehikel für den Transport von Nukleinsäure in höhere eukaryotische Zellen bekannt. Das beschriebene Copolymer wurde aus verzweigten PEI und linearen PEG  
10 aufgebaut. Für die PEGylierung des PEI wurde Methoxy-succinimidyl-propionat-PEG verwendet.

S. V. Vinogradov, T. K. Bronich und A. V. Kabanov (Bioconjugate Chem. 1998, 9, 805-812) beschreiben die Darstellung von PEI-PEG- und Polyspermin-PEG-  
15 Blockcopolymere durch Verwendung von verzweigtem PEI und verzweigtem Polyspermine durch Kopplungsreaktion mit einem mit 1,1'-Carbonyldiimidazol aktivierten MonomethoxyPEG. Die Copolymere wurden für die Komplexierung mit Oligonukleotiden verwendet.

In L. M. Bronstein, M. Antonietti, et. al. (Inorganica Chimica Acta 1998, 280, 348-354) werden PEI-PEG-Blockcopolymere und deren Herstellung durch Kopplung von  
20 verzweigtem PEI mit MonomethoxyPEG, das über eine endständige Säurechloridfunktion verfügt, und deren Verwendung zur Darstellung von Metallkolloiden beschrieben.

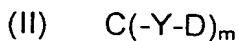
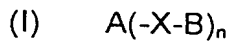
25 V. Toncheva et al. (Biochimica et Biophysica Acta 1998, 138, 354 – 358) betrifft Blockcopolymere, bestehend aus Poly(L-lysin) und mehreren hydrophilen Polymeren, wie PEG, Dextran und Poly(N-(2-hydroxypropyl)methacrylamid, Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung als Vehikel für den  
30 Gentransfer von Nukleinsäure.

Diese bekannten Blockcopolymere haben folgende drei Punkte gemeinsam.

1. Das kationische Polymer ist mit Seitenarmen eines hydrophilen, nichtionischen Polymers versehen.
2. In allen Fällen wurde dazu der reaktive Terminus des hydrophilen, nichtionischen Polymers für die Kopplungsreaktion mit dem kationischen Polymer durch ein Reagenz aktiviert, das im erzeugtem Copolymer ein Brückenglied zwischen den Blöcken darstellt.
3. Das hydrophile, nichtionische Polymer war in allen Fällen ein lineares Polymer.

Es wurden neue kationische Blockcopolymere der allgemeinen Formel I und II

10



15 gefunden, worin

A für ein hydrophiles, nichtionisches, lineares oder verzweigtes Polymer mit einem Molekulargewicht von 100 bis 10.000.000 g/mol, vorzugsweise von 1.000 bis 100.000 g/mol und insbesondere von 5.000 bis 50.000 g/mol steht;

20

B für ein lineares oder verzweigtes Polyethylenimin (PEI) mit einem Molekulargewicht von 100 bis 1.000.000 g/mol, vorzugsweise von 400 bis 100.000 g/mol und insbesondere von 600 bis 50.000 g/mol steht;

25 X für eine direkte Bindung der Blöcke A und B oder für ein Brückenglied mit folgenden Strukturen steht:

$-OC(O)NH(CH_2)_oNHC(O)NH-$  mit  $o = 1$  bis 20, vorzugsweise 2 bis 10, insbesondere 4 bis 6,

30

$-OC(O)NH(Aryl)NHC(O)NH-$  mit Aryl = aromatische Einheit mit vorzugsweise 6 – 14 C-Atomen bestehend aus einem oder mehreren aromatischen Kernen, die in

kondensierter oder in polyphenylischer Form miteinander verbunden sind, vorzugsweise mit einem Kern, insbesondere Toluy-,

-O(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>C(O)NH- mit p = 1 bis 10, vorzugsweise 1 bis 3, insbesondere 1,

5

-OCH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>NH-,

-OC(O)NH-, oder

10 -O(CH<sub>2</sub>)<sub>q</sub>NH- mit q = 1 bis 20, vorzugsweise 1 bis 6, insbesondere 1 bis 3;

n für eine ganze Zahl von 1) 1 bis 200, vorzugsweise,

2) 1 bis 50,

3) 1 bis 12,

15

4) 1 bis 8 oder, besonders bevorzugt,

5) 2 bis 8 steht;

C für ein lineares oder verzweigtes PEI mit einem Molekulargewicht von 100 bis 1.000.000 g/mol, vorzugsweise von 400 bis 100.000 g/mol und insbesondere von

20 600 bis 50.000 g/mol steht;

D für einen Rest eines über O gebundenen Polyethylenglykols der Formel

-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>-R<sup>1</sup>

25

steht, worin n = 3 bis 25.000, vorzugsweise 10 bis 5.000 und insbesondere 10 bis 1.000 ist und R<sup>1</sup> ein aliphatischer Rest oder ein zellulärer Ligand, um die spezifische Aufnahme eines Nukleinsäure-Copolymer-Komplexes durch Bindung an Zelloberflächenproteine, insbesondere Rezeptoren, zu bewirken, ist;

30

Y für eine direkte Bindung der Blöcke C und D oder für ein Brückenglied mit folgenden Strukturen steht:

-NHC(O)NH(CH<sub>2</sub>)<sub>s</sub>NHC(O)O- mit s = 1 bis 20, vorzugsweise 2 bis 10, insbesondere 4 bis 6,

-NHC(O)NH(Aryl)NHC(O)O- mit Aryl = aromatische Einheit mit vorzugsweise 6 bis 14 C-Atomen bestehend aus einem oder mehreren aromatischen Kernen, die in kondensierter oder in polyphenylischer Form miteinander verbunden sind, vorzugsweise mit einem Kern, insbesondere Toluyl-,

-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>C(O)O- mit t = 2 bis 10, vorzugsweise 2 bis 3, insbesondere 2,

-NHCH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>O-, oder

-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>O- mit u = 1 bis 20, vorzugsweise 1 bis 6, insbesondere 1 bis 3;

m für eine ganze Zahl von 1) 1 bis 200, vorzugsweise  
2) 1 bis 100, insbesondere  
3) 1 bis 50 steht.

Die erfindungsgemäßen kationischen Blockcopolymeren unterscheiden sich von den bekannten Blockcopolymeren in mindestens einem der drei folgenden Merkmalen:

1. Ein hydrophiles, nichtionisches Polymer ist mit Seitenarmen eines kationischen Polymers versehen.

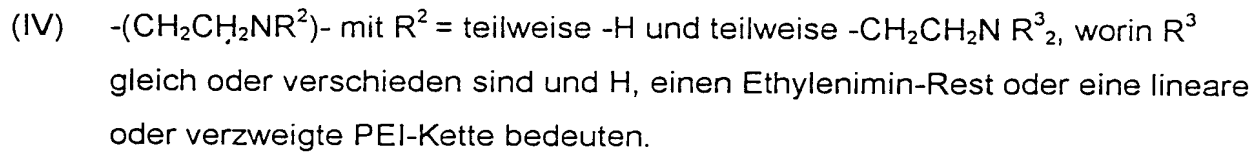
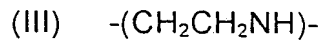
2. Die Brückenglieder unterscheiden sich von jenen bekannter Blockcopolymeren.

3. Sie weisen ein verzweigtes hydrophiles, nichtionisches Polymer auf.

Unter A werden vorzugsweise aus Kohlenstoff und Sauerstoff aufgebaute lineare oder verzweigte Polymere, die gegebenenfalls auch cyclische, sternförmige oder dendritische Strukturen enthalten können, wie beispielsweise Reste von linearem PEG, mehrarmig verzweigten PEG, sternförmige PEG, Polysaccharide einschließlich Cyclodextrine, PVA, Arborole (Dendrimere mit endständigen Hydroxygruppen), vorzugsweise aber lineare und mehrarmig verzweigte und sternförmige PEGs

verstanden. Letztere sind kommerziell u. a. von Aldrich, Fluka, Sigma und Shearwater erhältlich.

Unter B und C werden lineare oder verzweigte Polyethylenimine verstanden, welche die Formeln III oder IV aufweisen:



Diese können in an sich bekannter Weise hergestellt werden oder sind unter den BASF-Markennamen Lupasol® oder unter der Bezeichnung Polyethylenimin oder Ethylenimin Polymer in verschiedenen Molekulargewichten von 400 bis 2.000.000 g/mol im Handel (von Aldrich, Sigma, Fluka oder direkt von der BASF) erhältlich. Bevorzugt sind für B Polyethylenimine mit einem Molekulargewicht von 400 bis 2.000 g/mol und für C Polyethylenimine mit einem Molekulargewicht von 400 bis 800.000 g/mol, besonders bevorzugt von 400 bis 25.000 g/mol.

Die unter D beschriebenen Gruppen sind Reste von Polyethylenglykolen, die an einem Terminus durch einen Rest R, wie beispielsweise Methyl- geschützt sind. R kann aber auch eine Gruppe sein, die eine spezifische oder unspezifische biologische Funktion ausübt, insbesondere ein Ligand für Wechselwirkungen mit Rezeptoren zur zielzell-spezifischen Aufnahme eines Blockcopolymer-Wirkstoff-Komplexes in höhere eukaryotische Zellen und deren Zellkern, wobei der Wirkstoff vorzugsweise ein Oligonukleotid oder ein Gen darstellt (Gentargeting). R kann somit auch ein Ligand für eine spezifische Wechselwirkung und Aufnahme in Zielorgane oder -zellen, beispielsweise Proteine, insbesondere Antikörper oder Antikörperfragmente wie Fab,  $\text{F(ab)}_2$ , scFv, Cyto- oder Lymphokine, wie Interleukine (IL-2 bis x), Interferon GM-CSF, Wachstumsfaktoren, wie EGF, PDGF, FGF, EPO, Integrine wie ICAM, VCAM oder

Glykoproteine wie Lektine oder glykosilierte Proteine (s. o.) oder

Lipoproteine wie LDL, HDL oder

Transporterproteine wie Transferrin oder

Peptide wie LH-RH, Calcitonin, Oxytocin, Insulin, Somatostatin, IGF, RGD oder

5 Kohlenhydrate wie Galactose, Mannose, Glucose, Lactose oder

Hormone wie Steroide, THR oder

Vitamine wie B<sub>12</sub>, Folsäure

sein.

10 Die Erfindung betrifft auch Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der Formel I, die dadurch gekennzeichnet sind, daß man

a) Verbindungen der allgemeinen Formel V

15 (V)  $A-(OH)_n$  mit A und n = wie in Formel I

mit Diisocyanat, vorzugsweise Hexamethyldiisocyanat, umgesetzt und die daraus entstehende Verbindung mit Polyethylenimin mit den allgemeinen Formeln III und IV umgesetzt, oder

20

b) Verbindungen der allgemeinen Formel VI

(VI)  $A-(NH_2)_n$  (mit A und n = wie in Formel I definiert)

25 bei der Polymerisation von Ethylenimin dem Reaktionsansatz von Beginn der Polyreaktion an oder erst später im Verlauf der Polyreaktion zufügt, oder

c) Verbindungen der allgemeinen Formel VII

30 (VII)  $A-(OS(O)_2R^4)_n$  mit A wie in Formel I und R<sup>4</sup> = aliphatischer oder aromatischer Rest, bevorzugt p-Toluy, Fluorid, Trifluormethyl oder Methyl,

als Makroinitiator für die Polymerisation von Ethylenimin einsetzt.

Verbindungen der Formel VI sind in verschiedenen Molekulargewichten kommerziell beispielsweise von Shearwater erhältlich.

- 5 Verbindungen der allgemeinen Formel VII werden durch die Umsetzung von Verbindungen der allgemeinen Formel V mit Verbindungen der allgemeinen Formel VIII

(VIII)  $\text{Cl-S(O)}_2\text{R}^4$  ( $\text{R}^4$  wie oben definiert)

10

erhalten.

Die Erfindung betrifft weiterhin Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der Formel II, die dadurch gekennzeichnet sind, daß man

15

d) Verbindungen der allgemeinen Formel IX

(IX)  $\text{D-OH}$  (mit D wie in Formel II definiert)

- 20 zunächst mit Diisocyanat, vorzugsweise Hexamethylendiisocyanat, und anschließend die erhaltene Verbindung mit linearem oder verzweigtem Polyethylenimin umsetzt.

- 25 Das unter a) beschriebene Verfahren führt man vorzugsweise so durch, daß man je endständige Hydroxygruppe des Polymerblocks A einen 4 bis 20fachen Überschuß an Diisocyanat, vorzugsweise Hexamethylendiisocyanat, einsetzt. Die Reaktion wird in Chloroform bei Temperaturen von Raumtemperatur bis Siedetemperatur des Lösungsmittels, vorzugsweise aber bei Siedetemperatur des Lösungsmittels
- 30 durchgeführt. Die Reaktionsdauer wird zwischen 2 und 24 Stunden gewählt, vorzugsweise jedoch 4 Stunden. Die Polymerkonzentration im Reaktionsansatzes liegt zwischen 10 g/l und 500 g/l, vorzugsweise 100 g/l. Das Produkt wird durch Entfernen des Lösungsmittels bei vermindertem Druck und Entfernen des



überschüssigen Diisocyanates durch mehrfache Extraktion mit Petrolether (Siedebereich: 40-60°C) isoliert. Dieses Zwischenprodukt wird je endständiger Hydroxygruppe der Ausgangsverbindung mit einem 3 bis 10fachen Überschuß an PEI-Makromoleküle umgesetzt. Die Reaktion wird in Chloroform bei Temperaturen von Raumtemperatur bis Siedetemperatur des Lösungsmittels, vorzugsweise aber bei Siedetemperatur des Lösungsmittels durchgeführt. Die Reaktionsdauer wird zwischen 6 und 72 Stunden gewählt, vorzugsweise jedoch 12 Stunden. Die Polymerkonzentrationen, sowohl die des PEI als auch die des mit Hexamethylen-diisocyanat aktivierten nichtionischen hydrophilen Polymer im Reaktionsansatzes liegen zwischen 10 g/l und 500 g/l, vorzugsweise zwischen 30 - 200 g/l. Das Produkt wird durch Ausfällen des Polymers in einem 10 - 30fachen Volumenüberschuß an Diethylether isoliert. Durch mehrmaliges Umfällen mit dem Lösungsmittel Ethanol und Diethylether läßt sich das Blockcopolymer von überschüssigem PEI reinigen.

Das unter b) beschriebene Verfahren führt man durch, indem sowohl das Ethylenimin als auch das aminoterminierte hydrophile nichtionische Polymer in Wasser in einer Konzentration von jeweils 10 g/l bis 500 g/l vorgelegt werden. Das Molverhältnis der beiden Komponenten liegt zwischen 1 : 10 bis 1 : 10.000. Dann wird die Ethylenimin-Polymerisation durch Zugabe eines geeigneten Katalysators, beispielsweise Salzsäure, initiiert und der Ansatz auf eine Temperatur von 40 - 100°C gebracht. Das Copolymer wird durch eine Kettenabbruchreaktion erzeugt. Das Blockcopolymer wird durch mehrmaliges Umfällen mit Hilfe geeigneter Lösungsmittel, beispielsweise Ethanol und Diethylether und/oder durch Druckfiltration von möglicherweise als Nebenprodukt entstandenes Homopolymer PEI gereinigt. Eine Variation dieses Herstellungsverfahrens besteht darin, daß man das aminoterminierte hydrophile nichtionische Polymer erst nach einer gewissen Reaktionsdauer von 30 Minuten bis zu 72 Stunden zu dem heißen Polymerisationsansatz zugibt.

Das unter c) beschriebene Verfahren führt man durch, indem man die endständige(n) Hydroxygruppe(n) des Polymerblocks A mit einem Sulfonsäurechlorid der allgemeinen Formel VIII, insbesondere jedoch mit

Toluolsulfonsäurechlorid (Tosylchlorid) umgesetzt. Diese Reaktion wird in wäßrigen und/oder polaren organischen Lösungsmittel, vorzugsweise in einem Wasser/Tetrahydrofuran-Gemisch, bei Temperaturen von  $-10^{\circ}\text{C}$  bis Siedetemperatur des Lösungsmittel, bevorzugt bei Temperaturen von  $0^{\circ}\text{C}$  bis  $25^{\circ}\text{C}$ , und (falls nötig) in Gegenwart von Katalysatoren, wie beispielsweise Triethylamin oder Natriumhydroxid durchgeführt. Durch Entfernen des Lösungsmittels bei vermindertem Druck wird das Produkt isoliert. Dieses Polymer dient im folgenden als Makroinitiator bei der Ethylenimin-Polymerisation. Dazu wird das Produkt mit der allgemeinen Formel VII mit Ethylenimin in wäßrigen oder polaren organischen Lösungsmittel bei Temperaturen von  $0^{\circ}\text{C}$  bis Siedetemperatur des Lösungsmittel umgesetzt. Das Molverhältnis der beiden Komponenten liegt zwischen 1 : 10 bis 1 : 10.000. Bei dieser Reaktion entsteht kein Nebenprodukt. Das Endprodukt läßt sich durch Fällern des Polymers in einem geeignetem Lösungsmittel, wie beispielsweise Diethylether isolieren.

Das unter d) beschriebene Verfahren führt man vorzugsweise so durch, daß man eine Verbindung mit der allgemeinen Formel IX mit einem geringen Überschuß, beispielsweise einen 2 bis 10fachen Überschuß an Diisocyanat, vorzugsweise Hexamethylendiisocyanat, umgesetzt. Die Reaktion wird in Chloroform bei Temperaturen von  $20^{\circ}\text{C}$  bis Siedetemperatur des Lösungsmittels, vorzugsweise aber bei Siedetemperatur des Lösungsmittels durchgeführt. Die Reaktionsdauer wird zwischen 2 und 24 Stunden gewählt, vorzugsweise jedoch 10 bis 14 Stunden. Die Polymerkonzentration im Reaktionsansatzes liegt zwischen 10 g/l und 500 g/l, vorzugsweise 30 bis 150 g/l. Das Produkt wird durch Entfernen des Lösungsmittels bei vermindertem Druck und Entfernen des überschüssigen Diisocyanates durch mehrfache Extraktion mit Petrolether (Siedebereich:  $40-60^{\circ}\text{C}$ ) isoliert. Dieses Zwischenprodukt wird mit PEI-Makromolekül in einem Molverhältnis von 1 : 1 bis 100 : 1 umgesetzt. Die Reaktion wird in Chloroform und falls nötig mit einem Dimethylformamid-Zusatz bei Temperaturen von Raumtemperatur bis Siedetemperatur des Lösungsmittels, vorzugsweise aber bei  $60-70^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Die Reaktionsdauer wird zwischen 6 und 72 Stunden gewählt, vorzugsweise jedoch 12 Stunden. Die Polymerkonzentrationen, sowohl die des PEI als auch die des mit Hexamethylendiisocyanat aktivierten nichtionischen hydrophilen Polymers im

Reaktionsansatzes liegen zwischen 10 g/l und 500 g/l, vorzugsweise zwischen 30 - 200 g/l. Das Produkt wird durch Ausfällen des Polymers in einem 10 - 30fachen Volumenüberschuß an Diethylether isoliert.

5

Im Vergleich zu PEI weisen die neuen Verbindungen folgende Eigenschaften auf:

Die Blockcopolymere weisen in Cytotoxizitätstests eine geringere Toxizität auf als PEI-Homopolymere.

- 10 Die Blockcopolymere sind je nach Struktur mehr oder weniger oberflächenaktive Substanzen, die als Tenside Verwendung finden können.

Darüber hinaus können die Blockcopolymere auch

- in Klebstoff- und Lacksystemen als Additiv
- 15 • als Fixiermittel zur Verbesserung der Papierfestigkeit
- als Primer für Polymerverbundsysteme wie z. B. mehrlagige Verpackungsfolien
- zur Kunststoffmodifizierung (Verbesserung der Anfärbbarkeit, Lackierbarkeit, Barrierewirkung)
- zur Fixierung von Reaktivfarbstoffen auf Baumwolle
- 20 • als Flockungs- und Dispergiermittel bei feinverteilten Schwebstoffen in industriellen Abwässern
- zur Bindung von Schwermetallsalzen
- zur Dispergierung organischer und anorganischer Pigmente
- als Zusatz in keramischen und zementösen Bestandteilen
- 25 • für verschiedenste Funktionen in der Haut- und Haarkosmetik sowie im Dentalbereich
- zur Fixierung von medizinischen Wirkstoffen oder biologisch aktiven Verbindungen auf Oberflächen
- zur Filtration von Endotoxinen und Pathogenen aus Blutplasma
- 30 • zur Penetration durch Schleimhäute

verwendet werden.

Zudem bilden die Blockcopolymere in wäßrigen Systemen Komplexe mit Polynukleinsäuren, wie DNA und RNA. Aufgrund dieser Eigenschaft sind sie geeignet als Vehikel oder Vektoren für den Gentransfer (Penetration durch Zellmembranen und Translokation in den Zellkern). Sie können daher in

5 Transfektionsexperimenten, in der Gentherapie und Diagnostik Anwendung finden.

Die folgenden Beispiele dienen zur Erläuterung der Erfindung, ohne daß diese darauf beschränkt wäre.

10

Beispiel 1:

Darstellung eines PEI(PEG)<sub>n</sub>-Blockcopolymers

Aktivierung von mPEG-550

15

In einem 100 ml Rundkolben mit Magnetrührstab, Rückflußkühler und aufgesetztem Trockenrohr werden 10 ml Chloroform vorgelegt und mit 7 ml Hexamethyldiisocyanat (HMDI) (43,64 mmol, 8 eq.) versetzt. 3 g Polyethylenoxidmonomethylether (mPEG; M<sub>n</sub> = 550 g/mol) ( 5,45 mmol, 1 eq.)

20 werden in 40 ml Chloroform gelöst. Diese Lösung wird nun langsam unter Rühren zu der HMDI-Lösung getropft. Der Ansatz wird unter Rückfluß für 12 Stunden erhitzt.

Anschließend wird das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und das überschüssige HMDI mit Petrolether (40-60) (5 mal 50 ml) extrahiert. In nahezu quantitativer Ausbeute (3,8 g, 97%) wird das Produkt als farbloses dünnflüssiges Öl

25

erhalten.

Darstellung eines PEI-graft-PEG Blockcopolymers

In einem 100 ml Rundkolben mit Magnetrührstab, Rückflußkühler und aufgesetztem Trockenrohr werden 1,74 g bPEI (M<sub>w</sub> = 25 kDa, M<sub>n</sub> = 10 kDa, 0,1736 mmol, 1 eq.) eingewogen und mit 40 ml Dimethylformamid (DMF) in Lösung gebracht. 2,5 g des mit HMDI aktivierten mPEGs (M<sub>n</sub> = 720 Da, 3,47 mmol) werden in 10 ml Chloroform gelöst und diese Lösung wird unter Rühren langsam zur PEI-Lösung getropft. Der

30

Ansatz wird für 12 Stunden auf 60 - 70 °C erhitzt. Anschließend wird der Ansatz in 500 ml Diethylether getropft. Nach zwei Stunden hat sich ein zähflüssiges gelbliches Öl abgesetzt. Der trübe Überstand wird verworfen und das Öl in 30 ml Ethanol gelöst. Die Lösung wird wiederum in 500 ml Diethylether getropft und das erneut ausgefallene Öl durch Dekantieren isoliert. Das Produkt wird zum Filtrieren in Ethanol gelöst und im Vakuumtrockenofen bei 50°C von Lösungsmittel befreit. Es werden 2,8 g eines gelblichen zähflüssigen bis harzartigen Öls erhalten (Ausbeute: 45%).

- 5 In gleicher Weise können hergestellt werden: (alle Ausgangsverbindungen sind von Aldrich erhältlich)

Nr.	Ausgangsverbindungen / Homopolymere			
	Polyethylenimin	Hydrophiles, nicht ionisches Polymer	Molverhältnis PEI:PEG	Struktur des Blockcopolymers
2	IPEI $M_n$ ca. 423	mPEG $M_n$ ca. 550	1 : 1	AB-Diblock
3			1 : 2	ABA-Triblock
4	bPEI $M_w$ ca. 800	mPEG $M_n$ ca. 550	1 : 1	AB-Diblock
5			1 : 2	ABA-Triblock
6			1 : 4	sternförmig
7	bPEI $M_w$ ca. 800	mPEG $M_n$ ca. 5.000	1 : 1	AB-Diblock
8			1 : 2	ABA-Triblock
9			1 : 4	sternförmig
10	bPEI $M_w$ ca. 2.000	mPEG $M_n$ ca. 550	1 : 1	AB-Diblock
11			1 : 2	ABA-Triblock
12			1 : 4	sternförmig
13	bPEI $M_w$ ca. 2.000	mPEG $M_n$ ca. 5.000	1 : 1	AB-Diblock
14			1 : 2	ABA-Triblock
15	bPEI $M_w$ ca. 25.000	mPEG $M_n$ ca. 550	1 : 1	AB-Diblock
16			1 : 2	ABA-Triblock
17			1 : 4	sternförmig
18			1 : 20	sternförmig

19	bPEI $M_w$ ca. 25.000	mPEG $M_n$ ca. 2.000	1 : 1	AB-Diblock
20			1 : 2	ABA-Triblock
21			1 : 4	sternförmig
22			1 : 10	sternförmig
23	bPEI $M_w$ ca. 25.000	mPEG $M_n$ ca. 5.000	1 : 1	AB-Diblock
24			1 : 2	ABA-Triblock
25			1 : 4	sternförmig
26			1 : 10	sternförmig

### Beispiel 27: Darstellung eines PEG(PEI)<sub>n</sub>-Blockcopolymers

#### Aktivierung des verzweigten PEGs

In einem 100 ml Rundkolben mit Magnetrührstab, Rückflußkühler und aufgesetztem Trockenrohr werden 3,79 g HMDI (22,54 mmol, 80 eq.) in 10 ml Chloroform gelöst. Eine Lösung von 2 g eines achtarmig verzweigten PEG (bPEG, MW = 10 kDa, 0,2 mmol, 1 eq.) in 20 ml Chloroform wird unter Rühren langsam zu der HMDI-Lösung getropft. Der Ansatz wird für 4 Stunden zum Sieden erhitzt und bei Raumtemperatur 8 weitere Stunden nachgerührt. Unter vermindertem Druck wird das Lösungsmittel entfernt und das überschüssige HMDI mit Petrolether (40-60) extrahiert (3 mal 50 ml). Mit 58%iger Ausbeute (1,38 g) wird ein rötliches Öl erhalten.

#### Darstellung eines PEG-graft-PEI Blockcopolymeren

In einem 100 ml Rundkolben mit Magnetrührstab, Rückflußkühler und aufgesetztem Trockenrohr werden 2,20 g eines verzweigten PEIs (bPEI,  $M_w$  = 800 Da,  $M_n$  = 600 Da, 3,66 mmol, 25 eq.) in 20 ml Chloroform gelöst. Eine Lösung von 1,21 g des mit HMDI aktivierten bPEGs ( $M_n$  = 8,5 kDa, 0,14 mmol, 1 eq.) in 30 ml Chloroform wird bei Raumtemperatur zur PEI-Lösung unter Rühren langsam zugetropft. Der Ansatz wird für 12 Stunden zum Sieden erhitzt. Die Lösung wird dann in 500 ml Diethylether langsam unter Rühren eingetropft. Nach 12 Stunden hat sich ein zähflüssiges gelbliches Öl abgesetzt. Der trübe Überstand wird verworfen und das Öl in 50 ml

Ethanol gelöst. Die Lösung wird wiederum in 500 ml Diethylether getropft und das erneut ausgefallene Öl durch Dekantieren isoliert. Das Produkt wird zum Filtrieren in Ethanol gelöst und im Vakuumtrockenofen bei 50°C von Lösungsmittel befreit. Es werden 1,13 g eines gelblichen zähflüssigen bis harzartigen Öls erhalten (Ausbeute: 59%).

In gleicher Weise können hergestellt werden:

Nr.	Ausgangsverbindungen / Homopolymere		
	Hydrophiles, nicht ionisches Polymer	Polyethylenimin	Struktur des Blockcopolymers
28	MPEG $M_n$ ca. 5.000 (Aldrich)	IPEI $M_n$ ca. 423 (Aldrich)	AB
29		bPEI $M_n$ ca. 800 (Aldrich)	AB
30		bPEI $M_n$ ca. 2.000 (Aldrich)	AB
31	LPEG $M_n$ ca. 5.000 (Aldrich)	IPEI $M_n$ ca. 423 (Aldrich)	ABA
32		bPEI $M_n$ ca. 800 (Aldrich)	ABA
33		bPEI $M_n$ ca. 2.000 (Aldrich)	ABA
34	4armPEG MW ca. 15.000 (Shearwater)	IPEI $M_n$ ca. 423 (Aldrich)	AB <sub>4</sub>
35		bPEI $M_n$ ca. 800 (Aldrich)	AB <sub>4</sub>
36		bPEI $M_n$ ca. 2.000 (Aldrich)	AB <sub>4</sub>
37	8armPEG MW ca. 10.000 (Shearwater)	IPEI $M_n$ ca. 423 (Aldrich)	AB <sub>8</sub>
38		bPEI $M_n$ ca. 800 (Aldrich)	AB <sub>8</sub>
39		bPEI $M_n$ ca. 2.000 (Aldrich)	AB <sub>8</sub>
40	Star-PEG 429 MW ca. 250.000 (Shearwater)	IPEI $M_n$ ca. 423 (Aldrich)	AB <sub>13</sub>
41		bPEI $M_n$ ca. 800 (Aldrich)	AB <sub>13</sub>
42		bPEI $M_n$ ca. 2.000 (Aldrich)	AB <sub>13</sub>
43	$\alpha$ -Cyclodextrin (Aldrich)	IPEI $M_n$ ca. 423 (Aldrich)	AB <sub>18</sub>
44		bPEI $M_n$ ca. 800 (Aldrich)	AB <sub>18</sub>
45		bPEI $M_n$ ca. 2.000 (Aldrich)	AB <sub>18</sub>

46	$\beta$ -Cyclodextrin (Aldrich)	IPEI $M_n$ ca. 423 (Aldrich)	AB <sub>21</sub>
47		bPEI $M_n$ ca. 800 (Aldrich)	AB <sub>21</sub>
48		bPEI $M_n$ ca. 2.000 (Aldrich)	AB <sub>21</sub>
49	$\gamma$ -Cyclodextrin (Aldrich)	IPEI $M_n$ ca. 423 (Aldrich)	AB <sub>24</sub>
50		bPEI $M_n$ ca. 800 (Aldrich)	AB <sub>24</sub>
51		bPEI $M_n$ ca. 2.000 (Aldrich)	AB <sub>24</sub>
52	PVA 80% hydrolysiert $M_w = 9.000 - 10.000$	IPEI $M_n$ ca. 423 (Aldrich)	AB <sub>n</sub>
53		bPEI $M_n$ ca. 800 (Aldrich)	AB <sub>n</sub>
54		bPEI $M_n$ ca. 2.000 (Aldrich)	AB <sub>n</sub>

### Abkürzungen

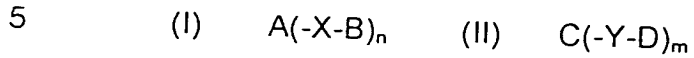
BPEG	Verzweigtes Polyethylenglykol (branched)
BPEI	Verzweigtes Polyethylenimin (branched)
DMF	Dimethylformamid
HMDI	Hexamethylendiisocyanat
LPEG	Lineares Polyethylenglykol (linear)
LPEI	Lineares Polyethylenimin (linear)
$M_n$	Zahlenmittel des Molekulargewichts
MPEG	Monomethoxypolyethylenglykol
$M_w$	Gewichtsmittel des Molekulargewichts
MW	Unbestimmtes Molekulargewichtsmittel



## Patentansprüche

116/99

## 1. Verbindung der Formel I oder II



in welcher

10 A für ein hydrophiles, nichtionisches, lineares oder verzweigtes Polymer mit einem Molekulargewicht von 100 bis 10.000.000 g/mol steht;

B für ein lineares oder verzweigtes Polyethylenimin (PEI) mit einem Molekulargewicht von 100 bis 1.000.000 g/mol steht;

15 X für eine direkte Bindung der Blöcke A und B oder für ein Brückenglied mit folgenden Strukturen steht:

$-OC(O)NH(CH_2)_oNHC(O)NH-$  mit  $o = 1$  bis 20,

20  $-OC(O)NH(Aryl)NHC(O)NH-$  mit Aryl = aromatische Einheit,

$-O(CH_2)_pC(O)NH-$  mit  $p = 1$  bis 10,

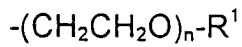
$-OC(O)NH-$ , oder

25  $-O(CH_2)_qNH-$  mit  $q = 1$  bis 20;

n für eine ganze Zahl 1 bis 200 steht;

30 C für ein lineares oder verzweigtes PEI mit einem Molekulargewicht von 100 bis 1.000.000 g/mol;

D für einen Rest eines über O gebundenen Polyethylenglykols der Formel

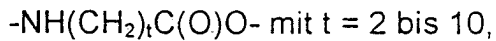
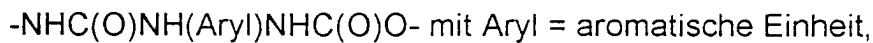
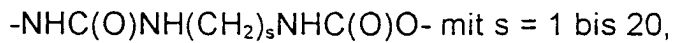


steht, worin  $n = 3$  bis 25.000 ist und  $\text{R}^1$  ein aliphatischer Rest oder ein zellulärer Ligand ist;

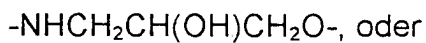
5

Y für eine direkte Bindung der Blöcke C und D oder für ein Brückenglied mit folgenden Strukturen steht:

10



15



20

und

m für eine ganze Zahl von 1 bis 200 steht.

25 2.

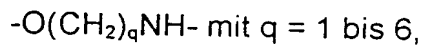
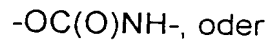
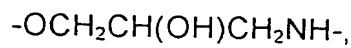
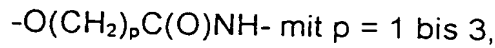
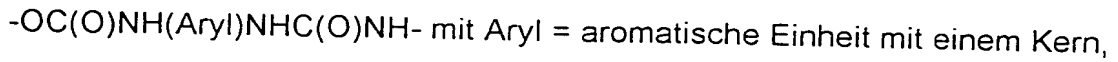
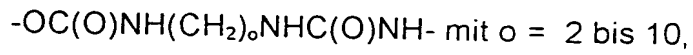
Verbindung gemäß Anspruch 1, in welcher

A für ein hydrophiles, nichtionisches, lineares oder verzweigtes Polymer mit einem Molekulargewicht von 1.000 bis 100.000 g/mol steht;

30

B für ein lineares oder verzweigtes Polyethylenimin (PEI) mit einem Molekulargewicht von 400 bis 100.000 g/mol steht;

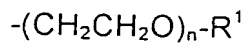
X für eine direkte Bindung der Blöcke A und B oder für ein Brückenglied mit folgenden Strukturen steht:



n für eine ganze Zahl von 1 bis 50,

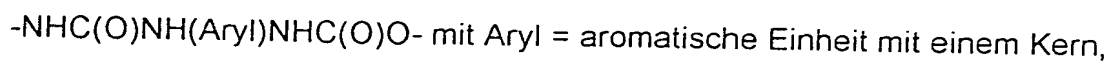
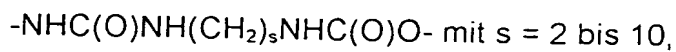
C für ein lineares oder verzweigtes PEI mit einem Molekulargewicht von 400 bis 100.000 g/mol steht;

D für einen Rest eines über O gebundenen Polyethylenglykols der Formel



steht, worin n = 10 bis 5.000 ist und R<sup>1</sup> ein aliphatischer Rest oder ein zellulärer Ligand ist;

Y für eine direkte Bindung der Blöcke C und D oder für ein Brückenglied mit folgenden Strukturen steht:



-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>t</sub>C(O)O- mit t = 2 bis 3,

-NHCH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>O-, oder

-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>u</sub>O- mit u = 1 bis 6;

und

m für eine ganze Zahl von 1 bis 100 steht.

3. Verbindung gemäß Anspruch 1 oder 2, in welcher

A für ein hydrophiles, nichtionisches, lineares oder verzweigtes Polymer mit einem Molekulargewicht von 5.000 bis 50.000 g/mol steht;

B für ein lineares oder verzweigtes Polyethylenimin (PEI) mit einem Molekulargewicht von 600 bis 50.000 g/mol steht;

X für eine direkte Bindung der Blöcke A und B oder für ein Brückenglied mit folgenden Strukturen steht:

-OC(O)NH(CH<sub>2</sub>)<sub>o</sub>NHC(O)NH- mit o = 4 bis 6,

-OC(O)NH(Aryl)NHC(O)NH- mit Aryl = Toluyl-,

-O(CH<sub>2</sub>)<sub>p</sub>C(O)NH- mit p = 1,

-OCH<sub>2</sub>CH(OH)CH<sub>2</sub>NH-,

-OC(O)NH-, oder

$-\text{O}(\text{CH}_2)_q\text{NH}-$  mit  $q = 1$  bis  $3$ ;

$n$  für eine ganze Zahl von  $1$  bis  $12$  steht;

5

C für ein lineares oder verzweigtes PEI mit einem Molekulargewicht von  $600$  bis  $50.000 \text{ g/mol}$  steht;

D für einen Rest eines über O gebundenen Polyethylenglykols der Formel

10

$-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{R}^1$

steht, worin  $n = 10$  bis  $1.000$  ist und  $\text{R}^1$  ein aliphatischer Rest oder ein zellulärer Ligand ist;

15

Y für eine direkte Bindung der Blöcke C und D oder für ein Brückenglied mit folgenden Strukturen steht:

$-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}(\text{CH}_2)_s\text{NHC}(\text{O})\text{O}-$  mit  $s = 4$  bis  $6$ ,

20

$-\text{NHC}(\text{O})\text{NH}(\text{Aryl})\text{NHC}(\text{O})\text{O}-$  mit Aryl = Toluyl-,

$-\text{NH}(\text{CH}_2)_t\text{C}(\text{O})\text{O}-$  mit  $t = 2$ ,

$-\text{NHCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{O}-$ , oder

25

$-\text{NH}(\text{CH}_2)_u\text{O}-$  mit  $u = 1$  bis  $3$ ;

und

30

$m$  für eine ganze Zahl von  $1$  bis  $50$  steht.

4. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, welche die Formel I aufweist.

5. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, welche die Formel II aufweist.

6. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, in welcher X für ein Brückenglied der Formel  $\text{-OC(O)NH(CH}_2\text{)}_6\text{NHC(O)NH-}$  steht.

7. Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 und 5, in welcher Y für ein Brückenglied der Formel  $\text{-NHC(O)NH(CH}_2\text{)}_5\text{NHC(O)O-}$  steht.

8. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung der Formel I gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man

a) Verbindungen der allgemeinen Formel V

(V)  $\text{A-(OH)}_n$  mit A und  $n =$  wie in Formel I

mit Diisocyanat umgesetzt, oder

b) Verbindungen der allgemeinen Formel VI

(VI)  $\text{A-(NH}_2\text{)}_n$  (mit A und  $n =$  wie in Formel I definiert)

bei der Polymerisation von Ethylenimin dem Reaktionsansatz von Beginn der Polyreaktion an oder erst später im Verlauf der Polyreaktion zufügt, oder

c) Verbindungen der allgemeinen Formel VII

(VII)  $\text{A-(OS(O)}_2\text{R}^4\text{)}_n$  mit A wie in Formel I und  $\text{R}^4 =$  aliphatischer oder aromatischer Rest als Makroinitiator für die Polymerisation von Ethylenimin einsetzt.

9. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der Formel II gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß man Verbindungen der allgemeinen Formel IX

5 (IX) D-OH (mit D wie in Formel II definiert)

zunächst mit Diisocyanat und anschließend die erhaltene Verbindung mit linearem oder verzweigtem Polyethylenimin umsetzt.

- 10 10. Verwendung einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 als Tensid.

11. Verwendung einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Komplexierung von Polynukleinsäuren in wäßrigen Systemen.

15

12. Verwendung einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Komplexierung von DNA in wäßrigen Systemen.

- 20 13. Verwendung einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Komplexierung von RNA in wäßrigen Systemen.

14. Zusammensetzung, die mindestens eine Nukleinsäure und eine Verbindung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 umfaßt.

25

## Kationische Blockcopolymere

5

Die Erfindung betrifft kationische Blockcopolymere der Formel  $A(-X-B)_n$  oder  $C(-Y-D)_m$ , in welchen A für ein hydrophiles Polymer, B für Polyethylenimin (PEI), X für eine Brücke, n für 1 – 200, C für PEI, D für den Rest eines Polyethylenglykols, Y für eine Brücke und m für 1 – 200 stehen, Verfahren zur ihrer Herstellung und ihre  
10 Verwendung u.a. als Tensid und zur Komplexierung von Nukleinsäuren.